

# 蛍光シリカナノ粒子 ～診断試薬への応用～

古河電気工業株式会社 横浜研究所

大久保 典雄

## Fluorescent Silica Nanoparticles —Application to Diagnostic Testing—

Michio Ohkubo

Yokohama R & D Laboratories, The Furukawa Electric Co., Ltd.

### 1. はじめに

蛍光検出技術を用いた生体分子の解析手法は、基礎研究分野における生命現象の解析、医薬品候補化合物のスクリーニング、遺伝子診断・再生医療などの先端医療分野および簡易診断分野には不可欠なツールである。例えば、DNA チップ、プロテインチップなどのマイクロアレイでは、基板上のオリゴヌクレオチドやペプチドを蛍光標識し、網羅的な解析に盛んに利用されている。また免疫染色やバイオイメージングでは、特定の物質を蛍光標識し観察することによって、細胞内や細胞間の物質の動態を解析することが可能となる。

これら蛍光を用いた解析手法では、ターゲットとなる細胞や抗原、オリゴヌクレオチド、ペプチドなどを標識するための蛍光試薬を利用されている。蛍光試薬に用いられている代表的な蛍光材料は、ナノメートルサイズの有機色素であり、有機色素を用いた蛍光材料は、生体高分子間の相互作用を FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) で解析するもの、特定の環境で発光・非発光が制御できるもの、生体透過性がある近赤

外領域の蛍光波長を発生し、体表から数センチ程度内部にある生きた組織を観察するために用いられるものなど、様々な種類が開発されている<sup>1)</sup>。しかし、有機色素自体が退色しやすい、輝度が弱いなどという使用上の問題があり、耐光性や輝度の向上が望まれている。

近年、有機色素に代わる新たな蛍光標識材料として、ナノテクノロジーが応用されたナノ粒子型の蛍光材料が注目を集めている。ナノ粒子型の蛍光材料としてよく知られているのが、半導体ナノ粒子である<sup>2)</sup>。半導体ナノ粒子は、粒径をナノサイズ化することで発現する量子サイズ効果により、可視光発光を可能とした無機蛍光粒子である。これまで半導体ナノ粒子は、表面欠陥に由来する発光効率の低下という問題があったが、近年表面改質技術が向上した結果、非常に発光効率が高い半導体ナノ粒子が開発され、高輝度で、耐光性に優れた蛍光材料として、イメージング試薬への利用が始まっている<sup>3)</sup>。しかし半導体材料に人体に有害なカドミウムなどを含んでいることが、特に医療分野への応用では課題として指摘されている。

本稿では、安全な材料からなる蛍光粒子の候補として検討を行ったきた蛍光シリカナノ粒子の合成法、さらに、バイオ・メディカル用標識プローブを目的として開発した粒子表面の修飾法および体外診断試薬応用への一例として、イ

〒220-0073 神奈川県横浜市西区岡野 2 丁目 4 番 3 号

TEL 045-311-1211

FAX 045-314-5190

E-mail : mo@ho.furukawa.co.jp

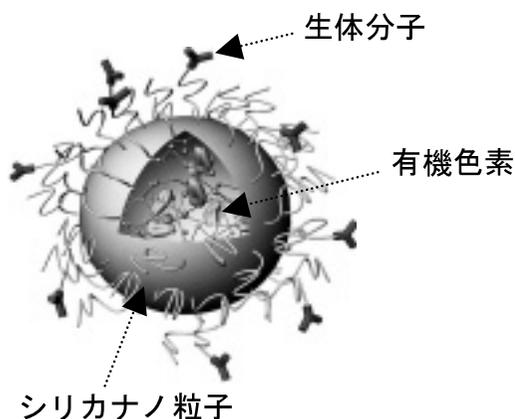


図1 QUARTZ DOT™の構造

ムノクロマト検査薬用標識粒子としての適用可能性を検証する。

## 2. QUARTZ DOT™

蛍光シリカナノ粒子「QUARTZ DOT™」は、図1に示すように、ナノサイズ化したシリカ（二酸化ケイ素）粒子内部に有機色素分子を高濃度に固定化した蛍光粒子であり、1個の粒子に有機色素分子を数個～数万個分含有させることにより、有機色素の弱点であった低輝度の問題を解決した蛍光材料である。また合成条件を変え粒子の大きさを調整することで、フローサイトメトリーなどの従来からの蛍光ラテックスビーズが用いられるバイオアッセイへの応用展開が可能となる。本章では、蛍光シリカ粒子の合成法及び粒径制御方法について紹介する。

### 2.1 シリカ粒子合成法

粒径1 $\mu$ m以下の微小なシリカ粒子の合成法には、溶液中で合成するゾル-ゲル法が古くから知られている。Stöberはアルコール溶媒中で、テトラアルコキシシランをアンモニアなどの弱塩基を用いて重合させ数十nmからミクロンサイズの粒子を得ている<sup>4)</sup>。Stöberの報告以来、ゾル-ゲル法によるシリカ粒子合成法は改良がなされ、van Blaaderenらは、有機色素を共有結合したシリカ粒子内部に固定したシリカ粒子の合成法とその特性について報告している<sup>5)</sup>。

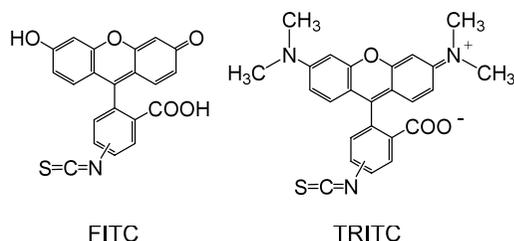


図2 FITC,TRITCの構造

### 2.2 有機色素の固定化方法

有機色素を固定化したシリカ粒子は、有機色素とシランカップリング剤を共有結合で結合した色素-シランカップリング剤複合体とTEOSを重合させることで得られる。シランカップリング剤と有機色素を結合する方法としては、図2に示すようなFITC (fluorescein isothiocyanate) やTRITC (tetramethyl rhodamine isothiocyanate) などのイソチオシアネート基を有する色素とAPS (3-aminopropyl triethoxysilane) をチオウレア結合で結合する方法<sup>5),6)</sup> や、NHS (N-hydroxysuccinimide) で活性化されたエステル基を有する色素とAPSをアミド結合で結合する方法<sup>7)</sup>が報告されている。有機色素の発光特性は、有機色素とシランカップリング剤の結合方法に影響され、合成後の粒子の発光強度を大きく左右する。従って有機色素とシランカップリング剤の結合手法は、用途に応じた適切な方法を選ぶ必要がある。

当社では、APSをアミド結合した色素-シランカップリング剤複合体を用いた蛍光シリカ粒子の合成を検討した。粒子は図3に示すように、色素-シランカップリング剤複合体およびTEOSを水-アルコール混合溶媒に溶解し、アンモニアを添加して重合させ、室温で数時間から1日混合することで合成される。本手法により、これまでにフルオレセイン、ローダミン6G, ROX (5(6)-carboxy-X-rhodamine), TAMRA (5(6)-carboxytetramethylrhodamine), クマリンなどの様々な波長の蛍光色素が導入可能である。

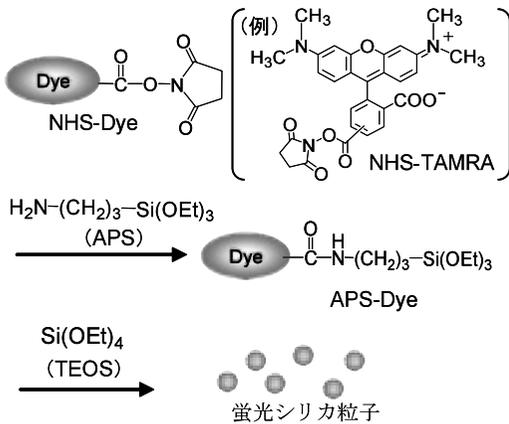


図3 蛍光シリカ粒子の合成法

### 2. 3 粒径制御

バイオ・メディカル分野における蛍光検出技術では、アプリケーションによって最適な粒径が異なる。例えば免疫染色やイメージングなどの微小領域の観察に用いる場合や、DNAチップ、プロテインチップなどのマイクロアレイへの応用には、標識物質へ直接染色を行うために30 nm以下の非常に小さな粒子が望ましいと考えられる。またイムノクロマト法では、感度の点から比較的に粒径が大きい30 nm～数百 nmの粒子が用いられている。一方、フローサイトメータを用いたビーズアッセイでは、粒子表面へ多くのリガンドを固定化するために、さらに大型の数ミクロンサイズの粒径の粒子が利用されている。

当社では、TEOSの添加量やアンモニア濃度、合成温度等のパラメータを変えながら、粒径の作り分けおよび粒度分布の狭窄化の検討を行った。その結果、図4に示すように、粒径が15 nm～500 nmで非常に均一性が高い粒子の合成に成功している。

### 3. 表面修飾法の開発

蛍光シリカ粒子を蛍光試薬として用いるためには、粒子表面をタンパク質やオリゴヌクレオチドなどの生体分子で表面修飾する必要がある。また、蛍光試薬は生理食塩水などの塩を含

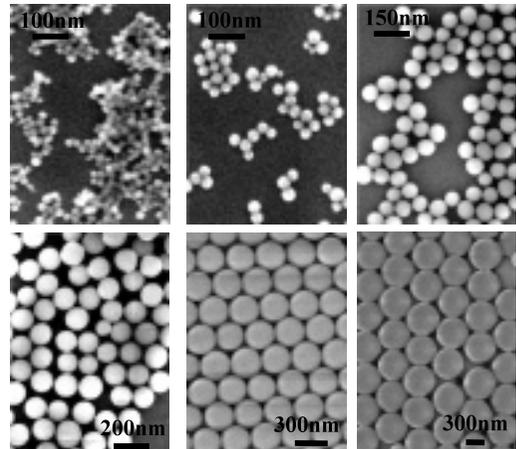


図4 粒径を作り分けた蛍光シリカ粒子

む緩衝液中で用いられるため、凝析を防止するための表面修飾が必須の技術となる。本稿ではこれらの表面修飾法について詳述する。

#### 3. 1 表面修飾の目的

##### 3. 1. 1 生体分子を結合するための官能基の導入

免疫染色や細胞イメージングへの応用では、ある量以上の抗体を粒子表面上に固定化し、その固定化された抗体に、細胞の内部や表面に提示された抗原を特異的に結合させる必要がある。

生体分子と粒子を結合させる方法は、物理化学的吸着によって結合させる方法と、粒子表面に付加する官能基により共有結合させる方法に大別される。

物理化学的吸着は、粒子と生体分子を緩衝液中で数時間から数日間混合し、粒子表面にファンデルワールス力やイオン結合によって生体分子を吸着させる方法である。この方法は操作は簡便であるが、粒子の表面状態や結合させる生体分子の種類によって結合量が一定しないという問題がある。

一方、粒子と生体分子を共有結合させる方法は、粒子表面に導入したカルボキシル基と生体分子のアミノ基を縮合剤を用いてアミド結合で結合する方法、図5に示すようなEMCS (N-

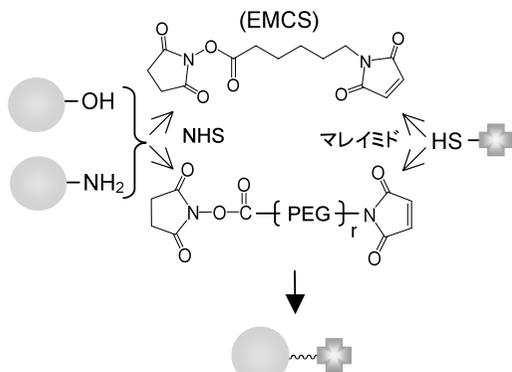


図5 架橋試薬

(6-Maleimidocaproyloxy) succinimide) や分子量数百～数千のポリエチレングリコールをスパーサーとする二価架橋剤を用いて架橋する方法などがある。また近年、高い選択性かつ高い反応性で2種類の化合物を共有結合できる「クリックケミストリー」が共有結合による生体分子の標識方法として注目を集めている<sup>8)</sup>。以上のような共有結合による結合方法は、生体分子を定量的かつ不可逆的に導入するのに適している。

### 3. 1. 2 塩を含む緩衝液中での分散安定化

蛍光試薬は、標的となる細胞や抗原、抗体、酵素、DNA、ペプチドなどの生体分子の安定性や活性を保持するために様々な緩衝液中で用いられるが、特にNaClやKClなどの塩が含まれる緩衝液中では、標識粒子は凝集体を生じ容易に凝析しその機能を失う。これは、粒子間で生じている静電反発力が電解質によって弱められるために起こる現象である。従って蛍光シリカ粒子の機能を発揮させるためには、高分子などを表面に修飾し、粒子表面に分散力を付与することによって凝析を防止する必要がある。

### 3. 2 交互吸着法

上述したように、シリカ粒子への官能基導入および凝析防止のために、シリカ粒子を機能性高分子で被覆する検討を行った。シリカ粒子を

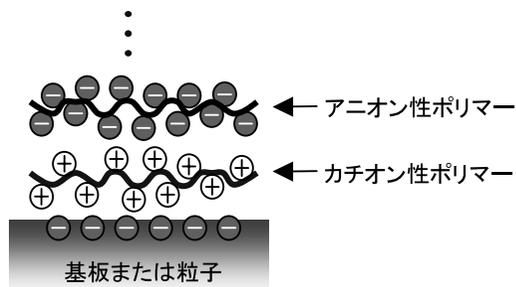


図6 交互吸着法

高分子で被覆する方法には、シリカ粒子表面にポリマーを重合させるコアシェル粒子とした方法が考えられるが、本稿では、一例として、比較的簡便な方法でシリカ粒子と高分子の複合化を可能とする交互吸着法 (Layer-by-Layer; LbL) を紹介する。

交互吸着法とは、図6に示すように、正の電荷を持つイオン性高分子及び負の電荷を持つイオン性高分子を、基板や粒子の表面に静電的引力によって交互に積層させた複合高分子被膜を形成する手法である<sup>9)</sup>。この方法を利用すれば、室温、水中などの温和な条件の下、比較的簡便な操作で粒子の表面修飾が可能である。

### 3. 3 交互吸着法による蛍光シリカナノ粒子の表面修飾

水中に分散している粒子は、その殆んどが帯電しており、静電的反発力によって分散を維持している。このような帯電した粒子の表面付近では、粒子と反対の符号を持つイオンが集まり、図7に示すような電気二重層を形成している。粒子表面に近い領域では、イオンは粒子の静電的相互作用を強く受けるために束縛されており、固定層または Stern 層と呼ばれている。さらに外側では、イオンは完全には束縛されず比較的自由に動いている。この領域を拡散層と呼ぶ。固定層と拡散層の境目をすべり面と呼び、無限遠を基準とした滑り面の電位をゼータ電位と呼ぶ<sup>10)</sup>。粒子の表面電位を直接測定することは困難であるが、ゼータ電位は電気泳動法

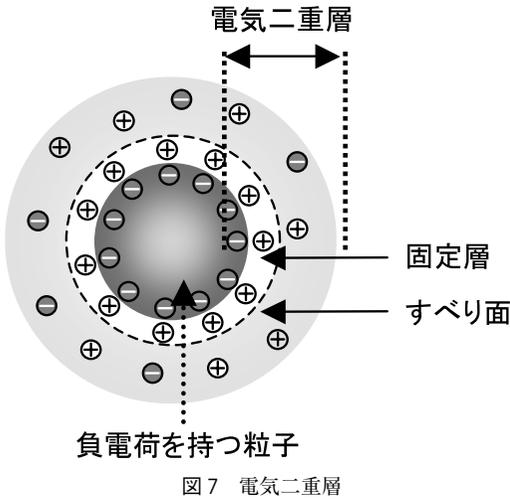


図7 電気二重層

などによって測定でき<sup>10)</sup>、液体に分散した粒子の表面状態を知る非常に重要な情報となっている。

蛍光シリカ粒子のゼータ電位は、蒸留水中で $-45\sim-55$  mV程度の値を示し、負の電位を持っている。そこで、図8に示すように、一層目にカチオン性高分子であるポリアリルアミン塩酸塩 (PAH)、二層目にアニオン性高分子であるポリアクリル酸ナトリウム (PAA) を積層することで、粒子表面に静電的引力を利用した交互吸着処理を行った。

交互吸着処理では、粒子とは反対の電荷を持つイオン性高分子が静電的に結合することにより、粒子のゼータ電位をマイナスからプラス、プラスからマイナスへと反転する。ゼータ電位の符号が反転する過程では、粒子間の静電反発力が一時的に弱められるために、粒子凝集が生じ易くなる。そこで交互吸着処理では、高分子溶液中に徐々にシリカ粒子を滴下し、粒子が速やかに高分子によって被覆される条件を詳細に検討した。その結果、交互吸着処理プロセスの粒子のゼータ電位は、図9に示すように、PAH処理によってゼータ電位がプラスへ反転、さらにPAA処理によってゼータ電位のマイナスへの反転を確認し、交互吸着処理過程での凝集が抑制されたシリカ粒子を得ることが可

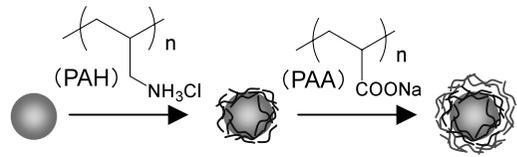


図8 蛍光シリカ粒子の交互吸着処理

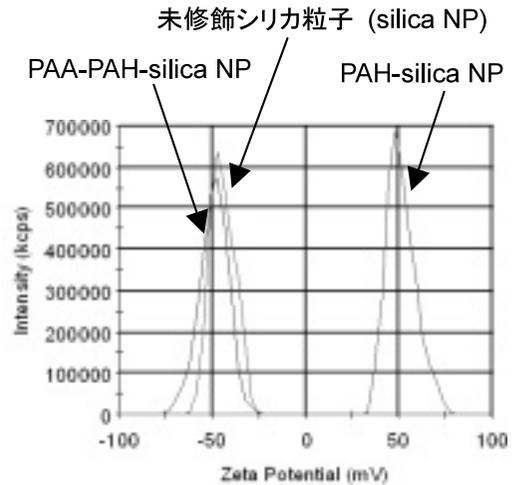


図9 LbL処理におけるゼータ電位の変化

能となった。

### 3.4 分散安定性の評価

交互吸着処理の効果を確認するため、得られた粒子のリン酸緩衝液中での分散安定性を評価した。交互吸着処理をした粒子を、50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.0) に0.9% NaClを添加したリン酸緩衝液に分散させ室温で放置したところ、30分後には粒子の沈降が生じた。これは、NaClの添加により静電的に吸着しているイオン性高分子の静電的引力が弱められ、高分子が粒子から脱離したことが原因と考えられる。従って塩を含む緩衝液中での分散安定化には、単に交互吸着でイオンの高分子を結合させるだけでなく、共有結合などのより強い結合力で高分子同士を固定化する必要があることを示唆している。

このような塩添加による粒子からの高分子の脱離を抑制するためには、図10に示すよう

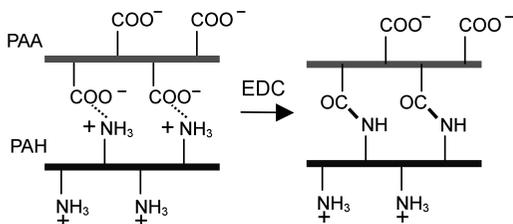


図 10 交互吸着層の縮合処理

な、PAH 側鎖にアミノ基と、PAA 側鎖のカルボキシル基を縮合させたアミド結合による高分子の網を形成させることが有効と考えられる。そこで、EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide) を用いて高分子の縮合処理を行い網構造を形成させたシリカ粒子を、0.9%のNaClを含むリン酸緩衝液 (pH 7.0) に分散させ、粒径の経時変化を動的分散乱法 (DLS) で評価した。その結果、図 11 に示すように、46 時間後も粒子は分散を維持しており、安定なコロイドとなっていることが確認できた。またこの粒子は、表面にカルボキシル基を有していることから、このカルボキシル基を利用して、抗体、アミノ基末端を持つオリゴヌクレオチド、酵素などを結合することが可能であると考えられる。

### 3. 5 吸着の防止

粒子の表面修飾は、不要な物質の吸着、すなわち非特異吸着を防止するという効果が期待できる。吸着は、蛍光試薬にとって次のような 2 つのデメリットを生じさせる。一つは、基板やメンブレンなどの部材への粒子の吸着である。蛍光試薬がマイクロアレイの基板やプレートアッセイに用いるプレートに吸着すると、ノイズが増大し感度低下を招く<sup>11)</sup>。もう一つは、標的以外の不純物の非特異的吸着である。蛍光検出に用いるサンプルには、細胞培養液や唾液、血清、尿など標的以外の不純物を含むものが多いが、粒子とそれらの不純物との非特異的吸着が生じると、擬陽性などの判定誤りの原因となる。このような非特異吸着の表面修飾技術によ

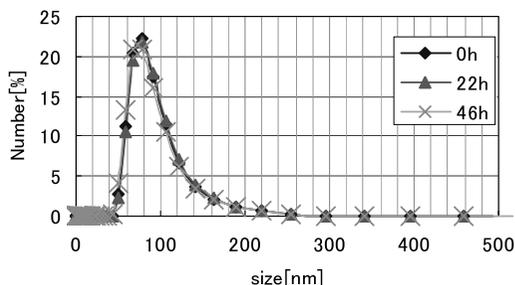
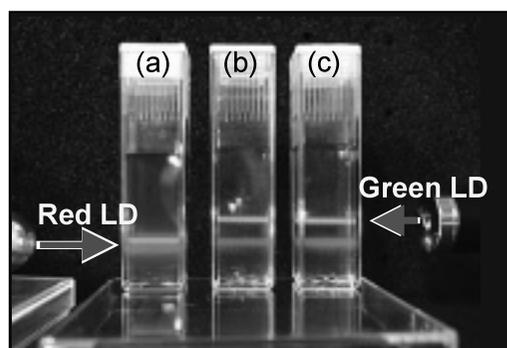


図 11 架橋処理した粒子の分散安定性



- (a)高濃度に色素が含有したシリカ粒子
- (b)蛍光に最適濃度の色素を含有するシリカ粒子
- (c)色素を含有しないシリカ粒子

図 12 シリカ粒子の吸発光状態  
Absorption and Fluorescence properties of silica nanoparticles

る抑制は、蛍光シリカ粒子を蛍光試薬に利用する際の非常に重要な特性となる。

## 4. 診断試薬用標識材料への応用

### 4. 1 着色ナノ粒子としての応用

有機蛍光色素を含んだ溶液は、色素濃度を高くしていくと、濃度消光によって蛍光が弱くなり、ついには全く蛍光発光を示さなくなる。蛍光シリカ粒子中に固定化される有機色素も同様の現象を示し、シリカ粒子に固定化する色素を増大させていくと、ついには蛍光発光しない粒子となる。一方、濃度増加と共に吸光度は単調に増加するので、色素を高濃度に固定化したシリカ粒子は着色粒子となる。

図 12 に、(a) TAMRA を高濃度に固定化し

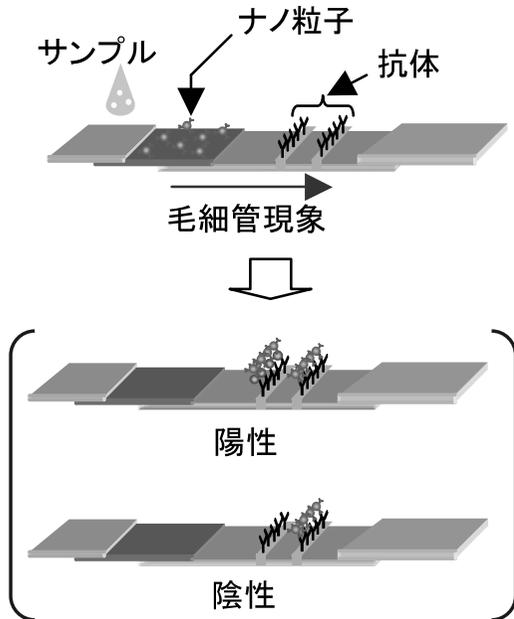


図13 イムノクロマト法

た着色シリカ粒子コロイド (左), (b) 蛍光が最大になる濃度で TAMRA を固定化した蛍光シリカ粒子 (中央) コロイド, (c) 色素が全く入っていない無色素シリカ粒子 (右) コロイドの写真を示す。左から, TAMRA 色素には透明な波長である赤色の LD (波長は 650 nm) を照射すると, それぞれのコロイドでチンダル現象によって光路が確認できる。一方, 右側から緑の LD (波長は 532 nm) を照射すると, 無色素粒子 (c) では緑色の光路が確認できる。一方, 中央の蛍光シリカコロイド (b) では LD からの光を吸収し蛍光発色した黄色の光路が確認できる。しかし, 着色シリカ粒子コロイド (a) では, シリカ粒子が LD からの光を完全に吸収し, 光路が確認できなくなる。このように, 色素を高濃度に固定化した着色シリカ粒子は非常に高い吸光度を示す。

そこでこの強い吸光度を有する着色シリカ粒子を, 目視による着色有無の確認により陽性・陰性の判定を行うイムノクロマト検査薬への応用を検討した。

#### 4.2 イムノクロマト法

イムノクロマト法とは, ①血清, 唾液, 尿などのサンプルに含まれる標的物質を, 抗体が結合した標識用ナノ粒子が補足, ②この標識粒子と標的物質の複合体が毛細管現象によってメンブレン中を移動, ③メンブレン中に固定化されたライン状の抗体に複合体が集積することによる発色, この一連のステップにより標的物質の陽性・陰性を判定する簡易検査試薬である (図 13)。

イムノクロマト法は操作が簡便で判定が容易であり, また比較的短時間で判定が可能なことから, インフルエンザ感染の判定や妊娠判定時の非常に有用なツールとして広く利用されている。また, 近年注目される POCT (Point Of Care Testing) に有効なツールとして, 感染症抗体や心筋マーカーなどの様々な診断ターゲットへの開発が進められている。

#### 4.3 抗体結合特性とその安定性

ナノ粒子をイムノクロマト試薬に用いるためには, 粒子表面に生体由来のタンパク質である抗体を安定的に結合する必要がある。ここでは, カルボキシル基で表面に修飾されたシリカ粒子への抗体結合およびその結合安定性について紹介する。

抗体は, 異物が体内に入ることによって免疫反応を起こし形成され, 抗原と特異的に結合する性質を持つタンパク質の総称で, 物質としては免疫グロブリン (Ig) と呼ばれる。多くの哺乳類では, その構造の違いから, IgG, IgA, IgM, IgD, IgE の 5 種類に分けられる。いずれも Y 字型を基本構造としており, アミノ酸配列に起因するアミノ基およびカルボキシル基を持っている。カルボキシル基を表面に持つナノ粒子との結合には, 抗体のアミノ基とのアミド結合が利用される。

ここでは, マウス由来の IgG 抗体との結合を行った例を紹介する。結合方法は, まず第 3 章で紹介した EDC を利用して, ナノ粒子表面

のカルボキシル基を活性化し、その後抗体を加えて抗体結合を行った。抗体結合を終了した粒子は、その結合量、および結合量が安定であるかどうかを確認するために、BCA法と呼ばれる一般的なタンパク質の定量化方法による測定を行った。その結果、粒子サイズが200 nmの粒子1 g当たり、約50 mgのIgGが結合することを確認した。また図15には、抗体結合処理した粒子をリン酸バッファー中に保存した際の抗体脱離量の時間依存性を示す。このように、カルボキシル基修飾されたシリカナノ粒子表面には、EMCSを利用することで安定的な抗体結合が可能であることを確認した。

#### 4. 4 シリカ粒子を用いたイムノクロマト検査薬の調製

本稿では、イムノクロマト法での動作確認のために、妊娠検査の際に判定に使用するhCG(ヒト絨毛性ゴナドトロピン)を検出するイムノクロマト試薬用標識粒子の試作例を紹介する。

粒子コロイドは、高濃度にTAMRAを含有させた着色シリカ粒子に、PAH及びPAAで交互吸着処理を行い、その後EDC及びSulfo-NHS共存下、抗hCG抗体を混合した。この処理は、PAHとPAAの架橋反応と抗体の結合を同時に行うことを意図している。

得られた粒子コロイドを、抗IgG抗体がライン状に塗布されたメンブレンに浸し、粒子を毛細管現象により展開させたところ、図14に示すように抗体のラインが赤く発色した。これは、粒子表面に結合された抗hCG抗体とメンブレン上の抗IgG抗体の反応を示しており、今後更なる検討により実際のイムノクロマト検査薬への応用が期待できる。

#### 4. 5 蛍光イムノクロマトへの展開

現在、イムノクロマト法の標識粒子には、金粒子や着色ラテックス粒子が使用されており、陽性・陰性の判定を目視で行う方法が主流であ

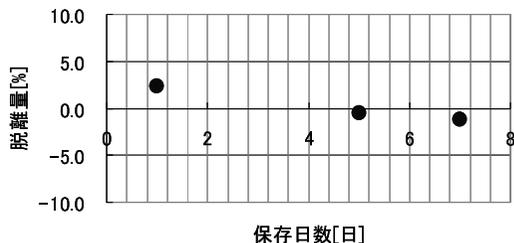


図15 IgG脱離量の時間依存性



図14 シリカ粒子でラインが発色したメンブレン

る。一方、イムノクロマト検査薬のアプリケーションの拡大には、高感度化などの特性向上が期待されており、例えば、磁気粒子を用いる用法などいくつかの手法が検討されているが、その中で有望視されているのが、標識粒子に蛍光粒子を利用し蛍光発光を検出する方法である。

金粒子は、金属ナノ粒子特有の強い吸収を示す表面プラズモンという現象を利用してイムノクロマト検査薬には広く使用されているが、原理的に蛍光発色しないために、蛍光型イムノクロマト試薬には適さない。一方、ラテックス粒子は、蛍光色素を導入した蛍光ラテックス粒子が市販されているが、疎水結合による非特異吸着を起こし易いといった課題がある。蛍光シリカ粒子は、シリカ粒子特有のシラノール基に起因した高い親水性を特徴しており、蛍光型イムノクロマト試薬用の標識粒子として非常に適していると考えている。

#### 5. おわりに

筆者自身は、本稿で紹介した蛍光試薬の開発に従事する以前は、バイオ分子の検出やバイオイメージングに多用されているArガスレーザの代替として通信用980 nm帯赤外半導体レーザと波長変換素子を組み合わせた488 nmレーザや、このレーザのバイオ検出機器への応用として細胞検出が可能なフローサイトメータの開

発に携わった<sup>12)</sup>。これらの開発の過程で、蛍光色素の特性向上策として粒子化する可能性を知り、バイオ・メディカル分野での応用には不可避である親水性に特徴があるシリカ粒子を選択し、その開発に着手した。

今回ご紹介したイムノクロマト法を始め、ラテックス凝集法などの粒子を担体と利用する方法は古くから知られているが、一方、粒子そのものを蛍光プローブとして用いるという手法は、まだ開発の緒に就いたばかりであり、粒子凝集の抑制や立体障害など解決すべき課題は多いが、ナノ粒子技術の進展と共に様々なアプリケーションが開発され応用されていくと考えられる。本稿で紹介したシリカナノ粒子技術が、この分野の発展に貢献できれば幸いである。

#### 参考文献

- 1) (a) S. Weiss: "Fluorescence Spectroscopy of Single Biomolecules," *Science*, 283(1999), 1676
- (b) T. Komatsu, K. Kikuchi, H. Takakusa, K. Hanaoka, T. Ueno, M. Kamiya, Y. Urano, and T. Nagano: "Design and Synthesis of an Enzyme Activity-Based Labeling Molecule with Fluorescence Spectral Change," *J. Am. Chem. Soc.*, 128(2006), 15946
- (c) W. M. Leevy, S. T. Gammon, H. Jiang, J. R. Johnson, D. J. Maxwell, E. N. Jackson, M. Marquez, D. Piwnka-Worms, and B. D. Smith: "Optical Imaging of Bacterial Infection in Living Mice Using a Fluorescent Near-Infrared Molecular Probe," *J. Am. Chem. Soc.*, 128(2006), 16476
- 2) A. P. Alivisatos: "Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots," *Science*, 271(1996), 933
- 3) X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, and S. Weiss: "Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics," *Science*, 307(2005), 538
- 4) Stober, W.; Fink, A. "Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range" *J. Colloid Interface Sci.*, 26(1968), 62
- 5) A. van Blaaderen and A. Vrij: "Synthesis and Characterization of Colloidal Dispersions of Fluorescent, Monodisperse Silica Spheres," *Langmuir*, 8(1992), 2921
- 6) A. Imhof, M. Megens, J. J. Engelberts, D. T. N. de Lang, R. Sprik, and W. L. Vos: "Spectroscopy of Fluorescein (FITC) Dyed Colloidal Silica Spheres," *J. Phys. Chem. B.* (Article); 103(1999), 1408
- 7) L. Wang and W. Tan, "Multicolor FRET Silica Nanoparticles by Single Wavelength Excitation," *Nano Letters*, 6(2006), 84
- 8) (a) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, "Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions," *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40(2001), 2004
- (b) A. Krasick, Z. Radic, R. Manetsch, J. Raushel, P. Taylor, K. B. Sharpless, and H. C. Kolb: "In Situ Selection of Lead Compounds by Click Chemistry: Target-Guided Optimization of Acetylcholinesterase Inhibitors," *J. Am. Chem. Soc.*, 127(2005), 6686
- (c) C. W. Tornøe, C. Christensen, and M. Meldal; "Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides," *J. Org. Chem.*, 67(2002), 3057
- 9) (a) S. S. Shiratori, T. Ito, and T. Yamada, "Automatic film formation system for ultra-thin organic/inorganic hetero-structure by mass-controlled layer-by-layer sequential adsorption method with 'nm' scale accuracy," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 198-200(2002), 415
- (b) Z. Li, D. Lee, M. F. Rubner, and R. E. Cohen, "Layer-by-layer Assembled Janus Microcapsules," *Macromolecules*, 38(2005), 7876
- (c) D. Lee, M. F. Rubner, and R. E. Cohen: "Formation of Nanoparticle-Loaded Microcapsules Based on Hydrogen-Bonded Multilayers," *Chem. Mater.* 17(2005), 1099
- 10) 北原文雄, 古澤邦夫: 最新コロイド化学, (1990), 講談社
- 11) R. P. Bagwe, L. R. Hilliard, and W. Tan; "Surface Modification of Silica Nanoparticles to Reduce Aggregation and Nonspecific Binding," *Langmuir*, 22(2006), 4357
- 12) 松浦 寛, 大久保 典雄, 徐 杰, 高木 武史: "バイオ用レーザと解析装置の開発", 2005 電子情報通信学会総合大会, CS-4-7